

# Plant-functional phosphinothricin resistance gene and its use.

**Publication number:** EP0275957

**Publication date:** 1988-07-27

**Inventor:** STRAUCH ECKHARD DR (DE); ARNOLD WALTER (DE); ALIJAH RENATE (DE); WOHLLEBEN WOLFGANG DR (DE); PUHLER ALFRED PROF DR (DE); ECKES PETER DR (DE); DONN GUNTER DR (DE); UHLMANN EUGEN DR (DE); HEIN FRIEDRICH DR (DE); WENGENMAYER FRIEDRICH DR (DE)

**Applicant:** HOECHST AG (DE)

**Classification:**






- international: **A01H1/00; A01H5/00; C12N1/20; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/10; C12N15/00; C12N15/09; C12N15/82; C12R1/19; C12R1/465; A01H1/00; A01H5/00; C12N1/20; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/10; C12N15/00; C12N15/09; C12N15/82; (IPC1-7): A01H1/00; C12N1/20; C12N5/00; C12N9/10; C12N15/00**

- european: C12N9/10C1; C12N15/82C8B4B

**Application number:** EP19880100631 19880119

**Priority number(s):** DE19873701624 19870121; DE19873737918 19871107

**Also published as:**

 JP63273479 (A)  
 JP10080289 (A)  
 JP10080278 (A)  
 FI880216 (A)  
 EP0275957 (A3)

more >>

**Cited documents:**

 EP0242246

**Report a data error here**

## Abstract of EP0275957

The phosphinothricin (PTC) resistance gene isolated from the genome of *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736 is synthesised - after adapting to the codon use in plants - and incorporated in gene structures which make these resistant against PTC after expression in plants.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

⑫ **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

⑲ Anmeldenummer: **88100631.6**

⑤① Int. Cl.<sup>4</sup>: **C12N 15/00**, **A01H 1/00**,  
**C12N 5/00**, **C12N 1/20**,  
**//C12N9/10**

⑳ Anmeldetag: **19.01.88**

Patentanspruch für folgende Vertragsstaat: ES.

③① Priorität: **21.01.87 DE 3701624**  
**07.11.87 DE 3737918**

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**27.07.88 Patentblatt 88/30**

⑥④ Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE**

⑦① Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**  
**Postfach 80 03 20**  
**D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)**

⑦② Erfinder: **Strauch, Eckhard, Dr.**  
**Rosenheide 2**  
**D-4800 Bielefeld(DE)**  
Erfinder: **Arnold, Walter**  
**Am Gottesberg 25**  
**D-4800 Bielefeld(DE)**  
Erfinder: **Aljiah, Renate**  
**Kösterkamp 14**  
**D-4800 Bielefeld(DE)**  
Erfinder: **Wohlleben, Wolfgang, Dr.**  
**Menzelstrasse 1**  
**D-4800 Bielefeld(DE)**  
Erfinder: **Pühler, Alfred, Prof. Dr.**  
**Am Waldschlösschen 2**  
**D-4800 Bielefeld(DE)**  
Erfinder: **Eckes, Peter, Dr.**  
**Am Flachsland 18**  
**D-6233 Kelkheim (Taunus)(DE)**  
Erfinder: **Donn, Günter, Dr.**  
**Sachsenring 35**  
**D-6238 Hofheim am Taunus(DE)**  
Erfinder: **Uhlmann, Eugen, Dr.**  
**Zum Talblick 31**  
**D-6246 Glashütten/Taunus(DE)**  
Erfinder: **Hein, Friedrich, Dr.**  
**Erlesring 40**  
**D-6234 Hattersheim am Main(DE)**  
Erfinder: **Wengenmayer, Friedrich, Dr.**  
**Am Seyenbach 38**  
**D-6238 Hofheim am Taunus(DE)**

**EP 0 275 957 A2**

⑤④ In Pflanzen wirksames Resistenzgen gegen Phosphinothricin und seine Verwendung.

⑤⑦ Das aus dem Genom von *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736 isolierte Phosphinothricin (PTC)-Resistenzgen wird - nach Anpassung an den Codongebrauch in Pflanzen -synthetisiert und in Genstrukturen eingebaut, die nach Expression in Pflanzen diese resistent gegen PTC machen.

## In Pflanzen wirksames Resistenzgen gegen Phosphinothricin und seine Verwendung

In der deutschen Patentanmeldung P 36 28 747.4 ist ein Resistenzgen gegen Phosphinothricin (PTC) vorgeschlagen, das aus der Gesamt-DNA von auf Phosphinothricyl-alanylalanin (PTT)-Resistenz selektiertem Streptomyces viridochromogenes DSM 40736 (allgemeine Sammlung) bzw. DSM 4112 (Hinterlegung unter Budapest Vertrag) durch Schneiden mit BamHI, Klonieren eines 4,0 kb großen Fragments und Selektion auf PTT-Resistenz erhältlich ist, sowie die Verwendung dieses Gens zur Herstellung PTC-resistenter Pflanzen, als PTT-Resistenz-Marker in Bakterien und als PTC-Resistenz-Marker in Pflanzenzellen. Das 4 kb große BamHI-Fragment, auf dem das Resistenzgen liegt, ist durch eine Restriktionskarte (Figur 1) näher definiert.

Durch Klonieren von Teilbereichen dieses 4 kb-Fragmentes wurde die Lage des Codierbereichs näher eingegrenzt. Hierbei zeigte sich, daß das Resistenzgen auf dem 1,6 kb SstII-SstI-Fragment (Positionen 0,55 bis 2,15 in Fig. 1 der Hauptanmeldung) liegt. Durch Verdauung mit BglII wird ein 0,8 kb großes Fragment gewonnen, das nach Einbau in ein Plasmid und Transformation von S. lividans PTT-Resistenz vermittelt. Diese Resistenz ist durch die N-Acetylierung von PTC bedingt. Das Resistenzgen codiert somit für eine Acetyltransferase.

In der Zusatzanmeldung P 36 42 829.9 ist die DNA-Sequenz des vorstehend genannten 0,8 kb-Fragments wiedergegeben. Aus der Sequenz läßt sich das Startcodon und der offene Leseraster der Gensequenz bestimmen. Das letzte Nucleotid ist Teil des Stop-Codons TGA.

Gene aus Streptomyceten besitzen mit einem Verhältnis Adenin (A) + Thymin (T) : Guanin (G) + Cytosin (C) von ca. 30 % : 70 % einen sehr hohen Anteil an G + C. Der GC-Anteil von Pflanzengenen liegt mit ca. 50 % weitaus niedriger. Aus diesem Grunde wurde in weiterer Ausgestaltung des Erfindungsgedankens die DNA-Sequenz des Resistenzgens durch Neusynthese auf einen für die pflanzliche RNA-Polymerase II günstigen Codongebrauch optimiert.

Die Erfindung betrifft eine Modifikation des Resistenzgens, das in der deutschen Patentanmeldung P 36 28 747.4 und der Zusatzanmeldung P 36 42 829.9 vorgeschlagen ist, nämlich eine Anpassung an den Codongebrauch in Pflanzen. Die entsprechende Aminosäuresequenz ist im Anhang wiedergegeben. Weitere Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Patentansprüchen definiert oder werden im folgenden erläutert.

Der genetische Code ist bekanntlich entartet, d.h. daß nur für 2 Aminosäuren ein einziges Triplet codiert, während den restlichen 18 genetisch codierbaren Aminosäuren 2 bis 6 Triplets zugeordnet sind. Für die Synthese des Gens steht somit theoretisch eine große Vielfalt von Codonkombinationen zur Auswahl. Da der genannte relative Anteil der einzelnen Nukleotide an der Gesamt-DNA-Sequenz von Einfluß ist, wurde er als eines der Kriterien bei der Sequenzoptimierung zugrunde gelegt.

Folgende Änderungen an dem sequenzierten Gen wurden durchgeführt:

1. Das Streptomycetengen-Startcodon GTG (Position 258-260 in der Sequenz der Zusatzanmeldung) wurde gegen das von der pflanzlichen RNA-Polymerase II benutzte Startcodon ATG ausgetauscht.
2. Innerhalb des Gens wurden die Streptomycetengencodons so verändert, daß in Pflanzengenen geeignete Codons daraus resultierten (G/C-Verhältnis).
3. Zur Beendigung des Translationsvorgangs wurde an das Ende der Sequenz das TGA-Stopcodon gesetzt.
4. Anfang und Ende der Gensequenz wurden mit überhängenden Enden von Restriktionsstellen versehen, um das Gen amplifizieren und zwischen pflanzliche Regulationssequenzen ligieren zu können.
5. Palindromische Sequenzen wurden auf ein Mindestmaß reduziert.

Die erfindungsgemäße DNA-Sequenz I (mit der entsprechenden Aminosäuresequenz) ist im Anhang wiedergegeben.

Drei interne singuläre Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XbaI (Position 152), BamHI (312) und XmaI (436) ermöglichen die Subklonierung von Teilsequenzen, die in gut untersuchte Klonierungsvektoren, wie etwa pUC18 oder pUC19, eingebaut werden können. Zusätzlich wurden innerhalb des Gens eine Reihe von weiteren singulären Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme eingebaut, die einerseits einen Zugang zu Teilsequenzen der Acetyltransferase schaffen und andererseits die Durchführung von Variationen erlauben:

|    | Restriktionsenzym | Schnitt nach Nucleotid-Nr.<br>(codierender Strang) |
|----|-------------------|--|
| 5  | BspMII            | 11   |
|    | SacII             | 64   |
|    | EcoRV             | 74   |
|    | HpaI              | 80   |
| 10 | AatII             | 99   |
|    | BstXI             | 139  |
|    | ApaI              | 232  |
| 15 | ScaI              | 272  |
|    | AvrII             | 308  |
|    | AflII             | 336  |
| 20 | StuI              | 385  |
|    | BssHII            | 449  |
|    | FokI              | 487  |
|    | BglI              | 536  |
| 25 | BglII             | 550  |

Der Aufbau der Teilsequenzen durch chemische Synthese und enzymatische Ligationsreaktion erfolgt in an sich bekannter Weise (EP-A 0 133 282, 0 136 472, 0 155 590, 0 181 504, 0 183 249, 0 171 024, 0 173 149 oder 0 177 827). Details wie Restriktionsanalysen, Ligation von DNA-Fragmenten und Transformation von Plasmiden in *E. coli* sind ausführlich im Lehrbuch von Maniatis (Molecular Cloning, Maniatis et al., Cold Spring Harbor, 1982) beschrieben.

Die so klonierte Gensequenz wird dann unter der Kontrolle pflanzlicher Regulationssignale in Pflanzen eingeführt und zur Expression gebracht. Die EP-A 0 122 791 gibt eine Übersicht über bekannte Methoden. Man erhält so PTC-resistente Pflanzenzellen (d.h. man hat ein Selektionsmerkmal für transformierte Zellen), Pflanzen bzw. Pflanzenteile und Samen.

In den folgenden Beispielen werden einige Ausgestaltungen der Erfindung im einzelnen erläutert. Prozentangaben beziehen sich hierbei auf das Gewicht, wenn nichts anderes angegeben ist.

#### 40 Beispiele

Die folgenden Medien wurden eingesetzt:

a) für Bakterien:

YT-Medium: 0,5 % Hefe-Extrakt, 0,8 % Bacto Trypton, 0,5 % NaCl

45 LB-Medium: 0,5 % Hefe-Extrakt, 1 % Bacto Trypton, 1 % NaCl

als Festmedium: jeweils Zugabe von 1,5 % Agar

b) für Pflanzen:

M + S-Medium: Siehe Murashige und Skoog, Physiologica Plantarum 15 (1962) 473

2MS-Medium: M + S-Medium mit 2 % Saccharose

50 MSC10-Medium: M + S-Medium mit 2 % Saccharose, 500 mg/l Cefotaxim, 0,1 mg/l Naphthylessigsäure (NAA), 1 mg/l Benzylaminopurin (BAP), 100 mg/l Kanamycin

MSC15-Medium: M + S-Medium mit 2 % Saccharose, 500 mg/l Cefotaxim, 100 mg/l Kanamycin.

55

## 1. Chemische Synthese eines einzelsträngigen Oligonukleotids

Als Ausgang für die Synthese des Fragments II, eines der vier Teilfragmente I - IV, diente das endständige Oligonukleotid IIc (Nukleotide Nr. 219 bis 312 des codierenden Stranges der DNA-Sequenz I). Für die Festphasensynthese wird das am 3'-Ende stehende Nukleosid, im vorliegenden Fall also Guanosin (Nukleotid Nr. 312), über die 3'-Hydroxyfunktion kovalent an einen Träger gebunden verwendet. Trägermaterial ist mit langkettigen Aminoalkylresten funktionalisiertes CPG ("Controlled Pore Glass"). Im übrigen folgt die Synthese den (aus den auf Seite 4, Zeile 3 - 4 genannten EP-A) bekannten Methoden.

Der Syntheseplan ist in die DNA-Sequenz II (Anhang) eingezeichnet, die im übrigen der DNA-Sequenz I entspricht.

## 2. Enzymatische Verknüpfung der einzelsträngigen Oligonukleotide zu dem Genfragment II

Zur Phosphorylierung der Oligonukleotide am 5'-Terminus wurde je 1 nmol der Oligonukleotide IIb und IIc mit 5 nmol Adenosintriphosphat und 4 Einheiten T4-Polynukleotid-Kinase in 20 µl 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,6), 10 mM Magnesiumchlorid und 10 mM Dithiothreitol (DTT) 30 Minuten bei 37°C behandelt. Das Enzym wird durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C deaktiviert. Die Oligonukleotide IIa und IIc, welche im DNA-Fragment II die "überhängende" Sequenz bilden, werden nicht phosphoryliert. Dies verhindert bei der nachfolgenden Ligation die Ausbildung größerer Subfragmente als sie dem DNA-Fragment II entsprechen.

Die Oligonukleotide II (a-d) werden wie folgt zum Subfragment II ligiert: Je 1 nmol der Oligonukleotide IIa und IIc sowie der 5'-Phosphate von IIb und IIc werden zusammen in 45 µl Puffer, enthaltend 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) 20 mM Magnesiumchlorid, 25 mM Kaliumchlorid und 10 mM DTT, gelöst. Für das "Annealing" der Oligonukleotide gemäß DNA-Fragment II wird die Lösung der Oligonukleotide 2 Minuten auf 95°C erhitzt und dann langsam (2-3 Stunden) auf 20°C abgekühlt. Zur enzymatischen Verknüpfung setzt man dann 2 µl 0,1 M DTT, 8 µl 2,5 mM Adenosintriphosphat (pH 7) sowie 5 µl T4-DNA-Ligase (2000 Units) zu und inkubiert 16 Stunden bei 22°C.

Die Reinigung des Genfragments II erfolgt durch Gelelektrophorese auf einem 10 %igen Polyacrylamid-gel (ohne Harnstoffzusatz, 20 • 40 cm, 1 mm Dicke), wobei als Markersubstanz ØX 174 DNA (Fa. BRL), geschnitten mit HinfI, oder pBR322, geschnitten mit HaeIII, diente.

Die Herstellung der Genfragmente I, III und IV erfolgt analog, wobei aber die "überhängenden" Sequenzen vor dem "Annealing" in die 5'-Phosphate übergeführt werden, da kein Ligationsschritt erforderlich ist.

## 3. Herstellung von Hybridplasmiden, die die Genfragmente I, II, III und IV enthalten.

### a) Einbau des Genfragmentes I in pUC18

Das handelsübliche Plasmid pUC18 wird in bekannter Weise mit den Restriktionsendonukleasen Sall und XbaI nach den Angaben der Hersteller geöffnet. Der Verdauungsansatz wird auf einem 1 %igen Agarosegel durch Elektrophorese in bekannter Weise aufgetrennt und die Bruchstücke durch Anfärben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Plasmidbande (ca. 2,6 kb) wird anschließend aus dem Agarosegel herausgeschnitten und durch Elektroelution von der Agarose abgetrennt.

1 µg Plasmid, mit XbaI und Sall geöffnet, wird dann mit 10 ng des DNA-Fragments I über Nacht bei 16°C ligiert.

### b) Einbau des Genfragmentes II in pUC18.

Analog zu a) wird pUC18 mit XbaI und BamHI aufgeschnitten und mit dem Genfragment II, das zuvor wie in Beispiel 2 beschrieben an den überhängenden Enden phosphoryliert wurde, ligiert.

### c) Einbau des Genfragmentes III in pUC18

Analog zu a) wird pUC18 mit BamHI und XmaIII aufgeschnitten und mit dem Genfragment III ligiert.

## d) Einbau des Genfragmentes IV in pUC 18

Analog zu a) wird pUC18 mit XmaIII und SalI geschnitten und mit dem Genfragment IV ligiert.

5

## 4. Aufbau des kompletten Gens und Klonierung in einem pUC-Plasmid

## a) Transformation und Amplifikation der Genfragmente I - IV

Die so erhaltenen Hybridplasmide werden in *E. coli* transformiert. Hierzu wird der Stamm *E. coli* K 12 durch Behandlung mit einer 70 mM Calciumchloridlösung kompetent gemacht und mit der Suspension des Hybridplasmids in 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5), der 70 mM an Calciumchlorid ist, versetzt. Die transformierten Stämme werden wie üblich unter Ausnutzung der durch das Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenzen bzw. -empfindlichkeiten selektioniert und die Hybridvektoren amplifiziert. Nach Abtöten der Zellen werden die Hybridplasmide isoliert, mit den ursprünglich eingesetzten Restriktionsenzymen aufgeschnitten und die Genfragmente I, II, III und IV durch Gelelektrophorese isoliert.

## b) Verknüpfung der Genfragmente I, II, III und IV zum Gesamtgen

20

Die durch Amplifikation erhaltenen Subfragmente I und II werden wie folgt verknüpft. Je 100 ng der isolierten Fragmente I und II werden zusammen in 10 µl Puffer, enthaltend 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 20 mM Magnesiumchlorid und 10 mM DTT, gelöst und diese Lösung wird 5 Minuten auf 57°C erhitzt. Nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt ist, gibt man 1 µl 10 mM Adenosintriphosphat (pH 7) sowie 1 µl T4-DNA-Ligase (400 Units) zu und inkubiert 16 Stunden bei Raumtemperatur. Nach dem Nachschneiden mit den Restriktionsenzymen SalI und BamHI wird das gewünschte 312 bp-Fragment (Nukleotide 1-312, SalI-BamHI) durch Gelelektrophorese auf einem 8 %igen Polyacrylamidgel gereinigt, wobei als Markersubstanz ØX 174 RF DNA (Fa. BRL), geschnitten mit dem Restriktionsenzym HaeIII, dient.

In gleicher Weise werden die Genfragmente III und IV miteinander verknüpft, wobei man nach der Reinigung ein 246 bp-Fragment (Nukleotide 313-558, BamHI-SalI) erhält. Als Marker bei der Gelelektrophorese wird pBR322, geschnitten mit dem Restriktionsenzym MspI, verwendet.

Zum Aufbau des Gesamtgens (DNA-Sequenz I) werden 15 ng des 312 bp-Fragmentes und 12 ng des 246bp-Fragmentes mit 1 µg des handelsüblichen Plasmids pUC18, das zuvor mit dem Restriktionsenzym SalI aufgeschnitten und an den Enden enzymatisch dephosphoryliert wurde, wie oben beschrieben ligiert. Nach der Transformation und Amplifikation (wie in Beispiel 4a) beschrieben) wird durch SalI-Verdauung der richtige Klon mit dem 558 bp-Fragment gemäß der DNA-Sequenz I identifiziert.

## 5. Transformation der Hybridplasmide

40

Kompetente *E. coli*-Zellen werden mit 0,1 bis 1 µg des Hybridplasmids, das die DNA-Sequenz I enthält, transformiert und auf Ampicillin enthaltenden Agarplatten plattiert. Anschließend lassen sich Klone, die die korrekt integrierten Sequenzen im Plasmid enthalten, durch DNA-Schnellaufarbeitung identifizieren (Maniatis a.a.O.).

45

## 6. Fusion des synthetisierten Gens an Regulationssignale, die in Pflanzen erkannt werden.

Das an den Enden mit SalI-Schnittstellen versehene optimierte Resistenzgen wurde in die SalI-Schnittstelle der Polylinkersequenz des Plasmides pDH51 (Pietrzak et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986) 5857) ligiert. Auf diesem Plasmid sind Promotor und Terminator des 35S-Transkripts aus Cauliflower Mosaic Virus lokalisiert, die vom pflanzlichen Transkriptionsapparat erkannt werden.

Durch die Ligation des Resistenzgens wurde dieses hinter dem Promotor und vor dem Terminator des 35S-Transkripts inseriert. Die korrekte Orientierung des Gens wurde durch Restriktionsanalysen bestätigt.

Der Promotor des ST-LS1-Gen aus *Solanum tuberosum* (Eckes et al., Mol. Gen. Genet. 205 (1986) 14) wurde ebenfalls zur Expression des optimierten Acetyltransferase-Gens in Pflanzen verwendet.

7. Einschleusen des Resistenzgens mit den Regulationssequenzen in Agrobacterium tumefaciens

## a) Kointegrat-Methode

Die gesamte Transkriptionseinheit aus Promotor, optimiertem Resistenzgen und Terminator (Beispiel 6) wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI ausgeschnitten und in die EcoRI-Schnittstelle des intermediären E. coli-Vektors pMPK110 ligiert (Peter Eckes, Dissertation, Univ. Köln, 1985, S. 91 f.). Dieser intermediäre Vektor war nötig, um das Resistenzgen mit seinen Regulationssequenzen in das Ti-Plasmid von Agrobacterium tumefaciens zu überführen. Diese sogenannte Konjugation wurde nach dem von Van Haute et al. (EMBO J. 2 (1983) 411) beschriebenen Verfahren durchgeführt. Dabei wurde das Gen mit seinen Regulationssignalen durch homologe Rekombination über die im pMPK110-Vektor und im Ti-Plasmid pGV3850kanR (Jones et al., EMBO J. 4 (1985) 2411) enthaltenen Sequenzen des Standardvektors pBR322 in das Ti-Plasmid integriert.

Dazu wurden je 50 µl frische Flüssigkulturen der E. coli-Stämme DH1 (Wirtstamm des pMPK110-Derivates) und GJ23 (Van Haute et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986) 5857) auf einer trockenen YT-Agarplatte vermischt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden in 3 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert und auf Antibiotika-Agarplatten ausplattiert (Spectinomycin 50 µg/ml: Selektion auf pMPK110; Tetracyclin 10 µg/ml: Selektion auf R64drd11; Kanamycin 50 µg/ml: Selektion auf pGJ28). Die auf den selektiven Agarplatten wachsenden Bakterien enthielten die drei Plasmide und wurden für die Konjugation mit Agrobacterium tumefaciens in YT-Flüssigmedium bei 37°C vermehrt. Die Agrobakterien wurden in LB-Medium bei 28°C kultiviert. Je 50 µl Bakteriensuspension wurden auf einer trockenen YT-Agarplatte vermischt und für 12 bis 16 Stunden bei 28°C inkubiert. Die Bakterien wurden in 3 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert und auf Antibiotikaplatten ausplattiert (Erythromycin 0,05 g/l, Chloramphenicol 0,025 g/l: Selektion auf den Agrobakterienstamm; Streptomycin 0,3 g/l und Spectinomycin 0,1 g/l: Selektion auf die Integration des pMPK110 in das Ti-Plasmid). Auf diesen selektiven Platten können nur Agrobakterien wachsen, bei denen das pMPK110-Derivat durch eine homologe Rekombination in das bakterielle Ti-Plasmid integriert ist.

Auf dem Ti-Plasmid pGV3850kanR war nun neben dem schon vorher vorhandenen, in Pflanzen wirksamen Resistenzgen gegen das Antibiotikum Kanamycin auch das Resistenzgen gegen PTC lokalisiert. Bevor diese Agrobakterienklone für die Transformation eingesetzt wurden, wurde durch ein "Southern-Blot"-Experiment überprüft, ob die gewünschte Integration erfolgt war.

## b) Binäre Vektor-Methode

Es wurde das binäre Vektorsystem, das von Koncz et al. (Mol. Gen. Genet. 204 (1986) 383) beschrieben worden war, verwendet. Der von Koncz et al. (PNAS 84 (1987) 131) beschriebene Vektor pPCV701 wurde folgendermaßen verändert: Mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII wurde ein Fragment, auf dem u.a. die Promotoren TR1 und TR2 lokalisiert sind, aus dem Vektor entfernt. Das resultierende Plasmid wurde rezirkularisiert. In die vorhandene EcoRI-Schnittstelle auf diesem Vektor wurde ein ca. 800 Basenpaare langes Fragment aus dem Vektor pDH51 inseriert, auf dem Promotor und Terminator des 35S-Transkripts aus Cauliflower Mosaic Virus lagen (Pietrzak et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986) 5858). Das resultierende Plasmid pPCV801 hatte zwischen 35S-Promotor und -Terminator eine singuläre SalI-Schnittstelle. In diese Schnittstelle wurde das optimierte PTC-Resistenzgen inseriert. Seine Expression stand nun unter der Kontrolle der 35S-Transkript-Regulationssequenzen.

Dieses Plasmid (pPCV801Ac) wurde in den E. coli-Stamm SM10 transformiert (Simon et al., Bio/Technology 1 (1983), 784). Zur Überführung des Plasmids pPCV801Ac nach Agrobacterium tumefaciens wurden je 50 µl der SM10-Kultur und einer C58-Agrobakterienkultur (GV3101, Van Larebeke et al., Nature 252 (1974) 169) mit dem Ti-Plasmid pMP90RK (Koncz et al., Mol. Gen. Genet. 204 (1986) 383) als Helferplasmid auf einer trockenen YT-Agarplatte vermischt und für ca. 16 Stunden bei 28°C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend in 3 ml 1 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert und auf Antibiotikaplatten ausplattiert (Rifampicin 0,1 g/l: Selektion auf GV3101, Kanamycin 0,025 g/l: Selektion auf pMP90RK, Carbenicillin 0,1 g/l: Selektion auf pPCV801Ac). Auf diesen Platten können nur Agrobakterien wachsen, die beide Plasmide (pMP90RK und pPCV801Ac) enthalten. Bevor diese Agrobakterien für die Pflanzentransformation eingesetzt wurden, wurde durch "Southern Blotting" überprüft, daß das Plasmid pPCV801Ac in seiner korrekten Form in den Agrobakterien vorhanden ist.

## 8. Transformation von Nicotiana tabacum durch Agrobacterium tumefaciens

Das optimierte Resistenzgen wurde mittels der sogenannten "leaf disc" Transformationsmethode in Tabakpflanzen übertragen.

- 5 Die Agrobakterien wurden in 30 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bei 28°C unter ständigem Schütteln herangezogen (etwa 5 Tage). Dann wurden die Bakterien durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 7000 rpm in einer Christ-Zentrifuge sedimentiert und einmal mit 20 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Bakterien in 20 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> suspendiert und in eine Petrischale überführt. Für die Blattscheiben-Infektion wurden Blätter von in Sterilkultur auf 2MS-Medium wachsenden Wisconsin 38-Tabakpflanzen verwendet. Alle Sterilkulturen wurden bei 25 bis 27°C in einem 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkel-Rhythmus bei Weißlicht gehalten.

Tabakblätter wurden abgeschnitten und die Blattoberflächen mit Sandpapier verwundet. Nach der Verwundung wurden die Blätter in kleinere Stücke zerschnitten und in die Bakterienkultur getaucht. Dann wurden die Blattstücke auf M+S-Medium transferiert und für zwei Tage unter normalen Kulturbedingungen gehalten. Nach der zweitägigen Infektion mit den Bakterien wurden die Blattstücke in flüssigem M+S-Medium gewaschen und auf MSC10-Agarplatten überführt. Transformierte Sprosse wurden aufgrund der mitübertragenen Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin selektioniert. 3 bis 6 Wochen später wurden die ersten Sprosse sichtbar. Einzelne Sprosse wurden auf MSC15-Medium in Glasdosen weiterkultiviert. In den folgenden Wochen bildeten einige der abgeschnittenen Sprosse an der Schnittstelle Wurzeln.

- 20 Transformierte Pflanzen konnten auch direkt auf PTC-haltigen Pflanzenmedien selektioniert werden. Durch DNA-Analyse ("Southern Blotting") und RNA-Analyse ("Northern Blotting") der transformierten Pflanzen wurde das Vorhandensein und die Expression des PTC-Resistenzgens nachgewiesen.

## 25 9. Nachweise der PTC-Resistenz der transformierten Pflanzen

- Zur Überprüfung der Funktionalität des Resistenzgens in transformierten Pflanzen wurden Blattfragmente transformierter und nichttransformierter Pflanzen auf M+S-Nährmedien mit  $1 \cdot 10^{-4}$  M L-PTC überführt. Die Fragmente nichttransformierter Pflanzen starben ab, während aus den Fragmenten transformierter Pflanzen neue Sprosse regeneriert werden konnten. Transformierte Sprosse bewurzelten und wuchsen ohne Probleme auf M+S-Nährmedien mit  $1 \cdot 10^{-3}$  M L-PTC. Transformierte Pflanzen wurden aus sterilen Bedingungen in Erde getopft und mit 2 kg/ha und 5 kg/ha PTC besprüht. Während nichttransformierte Pflanzen diese Herbizidbehandlung nicht überlebten, zeigten transformierte Pflanzen keine durch das Herbizid bewirkten Schädigungen. Das Aussehen und Wuchsverhalten der besprühten, transformierten Pflanzen war mindestens genauso gut wie bei unbesprühten Kontrollpflanzen.

## 10. Acetyltransferase-Test zum Nachweis der PTC-Acetylierung in transgenen, PTC-resistenten Pflanzen

- 40 Ca. 100 mg Blattgewebe von transgenen, PTC-resistenten Tabakpflanzen bzw. von nichttransformierten Tabakpflanzen wurden in einem Puffer, bestehend aus: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 2 mM EDTA; 0,1 mg/ml Leupeptin; 0,3 mg/ml Rinderserumalbumin; 0,3 mg/ml DTT; 0,15 mg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) homogenisiert.

- Nach anschließender Zentrifugation wurden 20 µl des klaren Überstandes mit 1 µl 10 mM radioaktiv markierten D,L-PTC und 1 µl 100 mM Acetyl-CoA für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit 25 µl 12 % Trichloressigsäure versetzt und abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 7 µl auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte übertragen und in einem Gemisch aus Pyridin : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (50 : 75 : 15 : 60 Volumenteile) aufsteigend zweimal entwickelt. PTC und Acetyl-PTC wurden so voneinander getrennt und konnten durch Autoradiographie nachgewiesen werden.
- 50 Nichttransformierte Pflanzen zeigten keine Umsetzung des PTC zum Acetyl-PTC, während transgene, resistente Pflanzen dazu in der Lage waren.



MET SER PRO GLU ARG ARG PRO VAL GLU ILE ARG PRO ALA THR ALA ALA ASP MET ALA VAL CYS ASP ILE VAL ASN HIS TYR  
 TC GAC ATG TCT CCG GAG AGG AGA CCA GTT GAG ATT AGG CCA GCT ACA GCA GCT GAT ATC GCT GAT ATC CAT TAC  
 G TAC AGA GGC CTC TCC TCT TCT GGT CAA CTC TAA TCC GGT CGA TGT CGT CGA CTA TAG CAA TTT GTA ATG

7

ILE GLU THR SER THR VAL ASN PHE ARG THR GLU PRO GLN THR PRO GLN GLU ASP LEU GLN ASP ARG TYR PRO  
ATT GAG ACG TCT ACA GTG AAC TTT AGG ACA GAG CCA CAM ACA CCA GAG TGG ATT GAT GAT CTA GAG AGG TTG CAA GAT AGA TAC CCT  
TAA CTC TGC AGA TGT CAC TTG AAA TCC TGT CTC GGT GTT TGT TGT GGT CTC ACC TAA CTA CTA GAT CTC TCC AAC GTT CTA TCT ATG GGA

100

TRP LEU VAL ALA GLU VAL GLY VAL VAL ALA GLY ILE ALA TYR ALA GLY PRO TRP LYS ALA ARG ASN ALA TYR ASP TRP THR VAL GLU  
TGG TGG GTT GCT GAG GTT GAG GGT GCT GCT ATT GCT TAC GCT GGG CCC TGG ANG GCT AGG AAC GCT TAC GAT TGG ACA GTT GAG  
ACC AAC CAA CGA CTC CAA CTC CCA CAA CAC CCA CCA TAA CAA ATG CGA CCC GGG ACC TTC CGA TCC TGG CGA ATG CTA ACC TGT CAA CTC

200

SER THR VAL TYR VAL SER HIS ARG HIS GLN ARG LEU GLY LEU GLY SER THR LEU TYR THR HIS LEU LEU LYS SER MET GLU ALA GLN GLY  
 AGT ACT GTT TAC GTG TCA CAT AGG CAA AGG TTG GGC CTA GGA TCC ACA TTG TAC ACA CAT TTG CTT AAG TCT ATG GAG GCG CAA GGT  
 TCA TGA CAA ATG CAC AGT GTA TCC GTA GTT TCC AAC CCG GAT CCT AGG TGT AAC ATG TGT GTA AAC GAA TTC AGA TAC CTC CCG GTT CCA

300

PHE LYS SER VAL VAL ALA VAL ILE GLY LEU PRO ASN ASP PRO SER VAL ARG LEU HIS GLU ALA LEU GLY TYR THR ALA ARG GLY THR LEU  
 TTT AAG TCT GTG GTT GCT GTT ATA GGC CTT CCA AAC GAT CCA TCT GTT AGG TTG CAT GAG GCT TTG TAC ACA GCC CGG GGT ACA TTG  
 AAA TTC AGA CAC CAA CGA CAA TAT CCG GAA GGT TTG CTA GGT AGA CAA TCC AAC GTA CTC CGA AAC CCT ATG TGT CGG GCC CCA TGT AAC

400

ARG ALA ALA GLY TYR LYS HIS GLY GLY TRP TRP HIS ASP VAL GLY PHE TRP GLN ARG ASP ARG LEU PRO ALA PRO ARG PRO VAL ARG  
CGC GCA GGT GGA TAC AAG CAT GGT GGA TGG CAT GAT GAT GGT TTT TGG CAA AGG GAT TTT GAG TTG CCA GCT CCT CCA AGG CCA GTT AGG  
CGG CGT CGA CCT ATG TTC GTA CCA CCT ACC GTA CTA CAA CCA AAA ACC GTT TCC CTA AAA CTC AAC GGT CGA GGA GGT TCC GGT CAA TCC

58

PRO VAL THR GLN ILE --- Aminosäure- und DNA-Sequenz I

CCA GTT ACC CAG ATC TGA G  
GGT CAA TGG GTC TAG ACT CAG CT

$\overrightarrow{\text{Ia}}$   
 MET SER PRO GLU ARG ARG PRO VAL GLU ILE ARG PRO ALA THR ALA ALA ASP MET ALA VAL CYS ASP ILE VAL ASN HIS TYR  
 TC GAC ATG TCT CCG GAG AGG AGA CCA GGT GAG ATT AGG CCA GCT ACA GCA GGT GAT ATG GAT TGT AAC CAT TAC  
 G TAC AGA GGC CTC TCC TCT TCT CAA CTC TAA TCC GGT CCA TGT GGT CCA TAC TAG CAA ACA CTA TAG CAA TTG GTA ATG  
 $\overleftarrow{\text{Ib}}$

$\overrightarrow{\text{Ia}}$   
 ILE GLU THR SER THR VAL ASN PHE ARG THR GLU PRO GLN THR PRO GLN GLU TRP ILE ASP ASP LEU GLU ARG LEU GLN ASP ARG TYR PRO  
 ATT GAG ACG TCT ACA GTG AAC TTT AGG ACA GAG CCA CAA ACA CCA GAG TGG ATT GAT GAT CTA GAG AGG TTG CAA GAT AGA TAC CCT  
 TAA CTC TGC AGA TGT CAC TTT AAA TCC TGT CTC GGT GGT TGT TGT GGT GGT CTA CTA GAT CTC TCC AAC GGT CTA TCT ATG GGA  
 $\overleftarrow{\text{Ib}}$

$\overrightarrow{\text{IIa}}$   
 TRP LEU VAL ALA GLU VAL GLY VAL VAL ALA GLY ILE ALA TYR ALA GLY PRO TRP LYS ALA ARG ASN ALA TYR ASP TRP THR VAL GLU  
 TGG TTG GTT GCT GAG GTT GAG GTT GTT GTG GCT GGT ATT GCT TAC GGT GGG CCC TGG AAG GGT TAC GAT TAC GAT TGG ACA GTT GAG  
 ACC AAC CAA CCA CTC CAA CTC CCA CAC CCA CCA TAA CCA ATG CCA CCC GGG ACC TTC CCA TCC TTG CGA ATG CTA ACC TGT CAA CTC  
 $\overleftarrow{\text{Ib}}$

$\overrightarrow{\text{IIc}}$   
 SER THR VAL TYR VAL SER HIS ARG HIS GLN ARG LEU GLY LEU GLY SER THR LEU TYR THR HIS LEU LEU LYS SER MET GLU ALA GLN GLY  
 AGT ACT GTT TAC GTG TCA AAG CAT AGG CAT CAA AGG TTG GGC CTA GGA TCC ACA CAT TTG CTT AGT TGT ATG GAG GCG CAA GGT  
 TCA TGA CAA ATG CAC AGT GTA TCC GTA GTT TCC AAC CCG GAT CCT AGT TGT AAC ATG TGT GTA AAC GAA TTC AGA TAC CTC GCG GTT CCA  
 $\overleftarrow{\text{Ib}}$

$\overrightarrow{\text{IIIa}}$   
 PHE LYS SER VAL VAL ALA VAL ILE GLY LEU PRO ASN ASP PRO SER VAL ARG LEU HIS GLU ALA LEU GLY TYR THR ALA ARG GLY THR LEU  
 TTT AAG TCT GTG GTT GCT GTT ATA GGC CTT CCA AAG GAT CCA TCT GGT AGG TTG CAT GAG GGT TTG GGA TAC ACA GCG CCG GGT ACA TTG  
 AAA TTC AGA CAC CAA CCA CCA TAT CCG GAA GGT TTG CTA GGT AGA CAA TCC AAC GTA CTC CGA AAC CCA GGT CCG CCA TGT AAC  
 $\overleftarrow{\text{Ib}}$

$\overrightarrow{\text{IVa}}$   
 ARG ALA ALA GLY TYR LYS HIS GLY GLY GLY TRP HIS ASP VAL GLY PHE TRP GLN ARG ASP PHE GLU LEU PRO ALA PRO PRO ARG PRO VAL ARG  
 CCG GCA GCT GGA TAC AAG CAT GGT GGA TGG CAT GAT GTT GGT TTT TGG CAA AGG GAT TTT GAG TTG CCA GGT CCT CCA AGG CCA GTT ARG  
 GCG CGT CCA CCT ATG TTC GTA CCA CCT ACC GTA CTA CCA AAA ACC GTT TCC CTA AAA CTC AAC GGT CCA GGA GGT TCC GGT CAA TCC  
 $\overleftarrow{\text{Ib}}$

$\overrightarrow{\text{IVa}}$   
 PRO VAL THR GLN ILE ---  
 CCA GTT ACC CAG ATC TGA G  
 GGT CAA TGG GTC TAG ACT CAG CT  
 $\overleftarrow{\text{IVb}}$

Aminosäure- und DNA-Sequenz II

## Ansprüche

5

1. Resistenzgen, codierend für das Protein der Aminosäuresequenz I (Anhang), dadurch gekennzeichnet, daß es an den Codongebrauch in Pflanzen angepaßt ist.

2. Resistenzgen nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die DNA-Sequenz I (Anhang, Nukleotidposition 9-554).

10 3. Genstruktur, gekennzeichnet durch die DNA-Sequenz I (Anhang), gekoppelt an in Pflanzen wirksame Regulations- und Expressionssignale.

4. Vektor, gekennzeichnet durch das Resistenzgen nach Anspruch 1 oder 2.

5. Vektor, gekennzeichnet durch eine Genstruktur nach Anspruch 3.

6. Vektoren, gekennzeichnet durch eines oder mehrere der Genfragmente I-IV.

15 7. Wirtszelle, gekennzeichnet durch einen Vektor nach Anspruch 4, 5 oder 6.

8. Pflanzenzelle, gekennzeichnet durch ein Gen nach Anspruch 1, 2 oder 3.

9. Pflanzen, deren Teile und Samen, gekennzeichnet durch ein Gen nach Anspruch 1, 2 oder 3.

10. Verwendung des Gens Anspruch 1 oder 2 bzw. der Genstruktur nach Anspruch 3 zur Erzeugung von Phosphinothricin-resistenten Pflanzenzellen, Pflanzenteilen, Pflanzen und Samen.

20

### Patentansprüche für den folgenden Vertragsstaat ES:

1. Verfahren zur Herstellung eines Resistenzgens gegen Phosphinothricin (PTC), dadurch gekennzeichnet, daß man ein Gen synthetisiert, das für das Protein der Aminosäuresequenz I (Anhang) codiert, wobei der Codongebrauch in Pflanzen berücksichtigt ist.

25 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen die DNA-Sequenz I (Anhang, Nukleotidposition 9-554) hat.

3. Verfahren zur Herstellung PTC-resistenter Pflanzenzellen, Pflanzen, Pflanzenteile oder Samen, dadurch gekennzeichnet, daß man ein nach Anspruch 1 oder 2 erhaltenes Gen an in Pflanzen wirksame Regulations- und Expressionssignale koppelt, die so erhaltene Genstruktur in Pflanzenzellen einbringt und darin zur Expression bringt.

35

40

45

50

55

**(12)** **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

**(21)** Anmeldenummer: 88100631.6

**(51)** Int. Cl. 4: **C12N 15/00 , A01H 1/00 ,**  
**C12N 5/00 , C12N 1/20 ,**  
**//C12N9/10**

**(22)** Anmeldetag: 19.01.88

**(3)** Priorität: 21.01.87 DE 3701624  
07.11.87 DE 3737918

**(43)** Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
27.07.88 Patentblatt 88/30

**(84)** Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE**

**(68)** Veröffentlichungstag des später veröffentlichten  
Recherchenberichts: 28.02.90 Patentblatt 90/09

**(71)** Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**  
Postfach 80 03 20  
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

**(72)** Erfinder: **Strauch, Eckhard, Dr.**  
**Rosenheide 2**  
**D-4800 Bielefeld(DE)**  
Erfinder: **Arnold, Walter**  
**Am Gottesberg 25**  
**D-4800 Bielefeld(DE)**  
Erfinder: **Alljah, Renate**  
**Kösterkamp 14**  
**D-4800 Bielefeld(DE)**  
Erfinder: **Wohlleben, Wolfgang, Dr.**  
**Menzelstrasse 1**  
**D-4800 Bielefeld(DE)**  
Erfinder: **Pühler, Alfred, Prof. Dr.**  
**Am Waldschlösschen 2**  
**D-4800 Bielefeld(DE)**  
Erfinder: **Eckes, Peter, Dr.**  
**Am Flachsland 18**  
**D-6233 Kelkheim (Taunus)(DE)**  
Erfinder: **Donn, Günter, Dr.**  
**Sachsenring 35**  
**D-6238 Hofheim am Taunus(DE)**  
Erfinder: **Uhlmann, Eugen, Dr.**  
**Zum Talblick 31**  
**D-6246 Glashütten/Taunus(DE)**  
Erfinder: **Hein, Friedrich, Dr.**  
**Erlesring 40**  
**D-6234 Hattersheim am Main(DE)**  
Erfinder: **Wengenmayer, Friedrich, Dr.**  
**Am Seyenbach 38**  
**D-6238 Hofheim am Taunus(DE)**

**EP 0 275 957 A3**

**(54)** In Pflanzen wirksames Resistenzgen gegen Phosphinothricin und seine Verwendung.

**(57)** Das aus dem Genom von Streptomyces viridochromogenes DSM 40736 isolierte Phosphinothricin (PTC)-Resistenzgen wird - nach Anpassung an den Codongebrauch in Pflanzen -synthetisiert und in

Genstrukturen eingebaut, die nach Expression in Pflanzen diese resistent gegen PTC machen.



| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE  |   |   |   |
|---|---|---|---|
| Kategorie   | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile   | Betrifft Anspruch                         | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)                                    |
| A   | MOL. GEN. GENET., Band 205, 1986, Seiten 42-50, Springer-Verlag; T. MURAKAMI et al.: "The bialaphos biosynthetic genes of Streptomyces hygroscopicus: Molecular cloning and characterization of the gene cluster"<br>* Insgesamt *<br>---   | 1-10                                      | C 12 N 15/00<br>A 01 H 1/00<br>C 12 N 5/00<br>C 12 N 1/20 //<br>C 12 N 9/10 |
| P,A   | THE EMBO JOURNAL, Band 6, Nr. 9, 1987, Seiten 2519-2523, IRL Press Ltd, Oxford, GB; C.J. THOMPSON et al.: "Characterization of the herbicide-resistance gene bar from Streptomyces hygroscopicus"<br>* Insgesamt *<br>---   | 1-10                                      |   |
| P,A   | THE EMBO JOURNAL, Band 6, Nr. 9, 1987, Seiten 2513-2518, IRL Press Ltd, Oxford, GB; M. DE BLOCK et al.: "Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme"<br>* Insgesamt *<br>---  | 1-10                                      |   |
| P,A   | EP-A-0 242 246 (PLANT GENETIC SYSTEMS)<br>* Seite 21, Zeile 50 - Seite 24, Zeile 36 *<br>---  | 1-10                                      |   |
| A   | CHEMICAL ABSTRACTS, Band 105, 1986, Seite 164, Zusammenfassung Nr. 55584k, Columbus, Ohio, US; J.B. OHLROGGE et al.: "Spinach acyl-carrier proteins: structure, regulation, and progress towards cloning", & BIOCHEM. SOC. TRANS. 1986, 14(3), 579-81<br>* Zusammenfassung *<br>----- | 1-10                                      |   |
| Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt   |   |   |   |
| Recherchenort<br>DEN HAAG   |   | Abschlußdatum der Recherche<br>23-11-1989 | Prüfer<br>MADDOX A.D.   |
| <b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</b><br>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet<br>Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie<br>A : technologischer Hintergrund<br>O : nichtschriftliche Offenbarung<br>P : Zwischenliteratur<br>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze<br>E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist<br>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument<br>L : aus andern Gründen angeführtes Dokument<br>& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument |   |   |   |